

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1942-1943. — N° 25

Les Résines Polyvinyliques comme masse d'inclusion histologique

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE et de PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 10 Novembre 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Pierre **BOURDON**

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

MONITEUR DE TRAVAUX PRATIQUES D'HISTOLOGIE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON

Né le 28 Avril 1917, à Versailles (S.-et-O.).



IMPRIMERIE DE TREVOUX

G. Patissier

—
1942

LES RESINES POLYVINYLIQUES
comme masse d'inclusion histologique

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1942-1943. — N° 25

Les Résines Polyvinyliques comme masse d'inclusion histologique

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE et de PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 10 Novembre 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Pierre BOURDON

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

MONITEUR DE TRAVAUX PRATIQUES D'HISTOLOGIE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON

Né le 28 Avril 1917, à Versailles (S.-et-O.).



IMPRIMERIE DE TRÉVOUX

G. Patissier

—
1942

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE
Assesseur	M. A. MOREL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. HUGOUNENQ, PIC, PAVIOT, NICOLAS, VILLARD, NOVE-JOSSERAND
TIXIER, COLLET, GAYET, CLUZET, BÉRARD, COURMONT, GUIART,
PIERY, CADE, THEVENOT Léon.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. FROMENT
Cliniques chirurgicales	SAVY
Clinique obstétricale et Accouchements	PATEL
Clinique ophtalmologique	SANTY
Cliniques dermatologique et syphiligraphique	RHENTER
Clinique neurologique et psychiatrique	BONNET
Clinique médicale infantile	FAVRE
Clinique gynécologique	LEPINE (J.)
Clinique Oto-rhino-laryngologique	MOURIQUAND
Clinique urologique	COÏTE
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	REBATTU
Clinique et prophylaxie de la tuberculose	CIBERT
Clinique des maladies infectieuses	TAVERNIER
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie	DUFOURT
Chimie biologique et médicale	X...
Chimie organique et Toxicologie	PONTHUS
Matière médicale et Botanique	FLORENCE
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	MOREL
Anatomie	MANCEAU
Histologie	GARIN
Physiologie	LATARJET
Pathologie interne	POLICARD
Pathologie générale et thérapeutique	HERMANN
Anatomie pathologique	CORDIER
Chirurgie opératoire	DECHAUME
Médecine expérimentale et comparée et Bactériologie	J. F. MARTIN
Médecine légale	X...
Hygiène	ARLOING (F.)
Pharmacie et Pharmacologie	MAZEL
Hydrologie thérapeutique et Climatologie	ROCHAIX
	LEULIER
	GATE

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours d'Embryologie.....	MM. NOEL
Chargé d'un cours d'Anatomie.....	GABRIELLE
Chargé d'un cours de Toxicologie.....	CHAMBON

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
REVOL	CROIZAT	CLAVEL	FROMENT (R.)
ENSELME	DELORE	LEVRAT	MARTIN (P.-E.)
SEDALLIAN	JOSSERAND	BANSSILLON	MOUNIER-KUHN
GREYSEL	MORIN	MALET-GUY	BROUSSY
DE ROUGEMONT	PIGEAUD	ROMAN	PIFFAULT
P. RAVAUULT	BERTRAND	PEYCELON	JOURDAN

Examineurs de la Thèse

M. POLICARD, *Président*.

MM. J.-F. MARTIN, NOËL et BROUSSY, *Assesseurs*.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR POLICARD

Qui m'a accueilli dans son laboratoire où il a si paternellement guidé mes efforts, avec toute ma gratitude.

A MES JUGES

A TOUS MES MAITRES CIVILS ET MILITAIRES

J'offre ce travail en reconnaissance de l'enseignement qui me fut prodigué tant à la Faculté de Médecine qu'à l'Ecole du Service de Santé.

Introduction

Faire une inclusion histologique, c'est remplacer l'eau d'imbibition des tissus par un liquide susceptible de se solidifier. La masse solide ainsi obtenue soutient les éléments divers qui constituent l'organe étudié et permet de la débiter en tranches minces. Pour obtenir la coupe de tissus, on élimine ensuite par un solvant la masse solide, dite masse d'inclusion.

Pratiquement, on utilise comme tel liquide, soit l'eau d'imbibition elle-même : c'est la technique de congélation la plus simple théoriquement mais ne permettant pas les coupes minces, ni le collage sur lames de ces coupes ; soit encore la paraffine, qui pénètre à chaud l'objet et se solidifie par refroidissement ; soit le collodion qui pénètre l'objet à l'état de dissolution à froid et que l'on solidifie par élimination à froid également, du solvant.

Les avantages et les inconvénients de ces divers procédés sont connus de tous ; ils seront rapidement examinés dans ce travail.

Nous aurons en effet, ici, pour but l'étude d'un procédé nouveau d'inclusion et de sa comparaison avec les

procédés classiques. Nous utilisons comme masse d'inclusion un liquide organique particulier, l'acétate de vinyle, pénétrant la pièce à froid, que l'on durcit ensuite par polymérisation à 37°, en vase clos. Ce procédé est fort peu agressif pour les tissus, donne des coupes minces comme la paraffine, solides et non déchirables comme le collodion, mais ne se prête pas, au moins jusqu'à présent, à la confection de coupes sériées en rubans. Avant de l'exposer par le détail, un bref historique des deux principales techniques d'inclusion nous paraît toutefois nécessaire.

En 1879, MATHIAS DUVAL (1) publiait un procédé d'inclusion au collodion humide et, en 1881, GIESBRECHT (2) faisait connaître le premier procédé d'inclusion à la paraffine, utilisant comme solvant intermédiaire le chloroforme qu'il éliminait par évaporation progressive. Ainsi apparurent les deux techniques principales encore utilisées de nos jours pour la confection des coupes histologiques.

Le procédé de GIESBRECHT ne devxait pas entrer immédiatement dans la pratique courante. Il fallut, pour cela, qu'en 1883 MAYER (3) établît une étuve permettant de maintenir facilement la paraffine en fusion ; que ce même auteur imagina un procédé commode pour étaler et coller les coupes sur les lames de cerre ; que BRASS (4) en 1885, préconisa l'emploi du toluène ou du benzène comme solvant intermédiaire pour que la technique prit sa forme actuelle. Vers 1887, LATTEUX (5) ne mentionne l'inclusion à la paraffine que comme un procédé tout à fait spécial, réservé aux études embryologiques ; les tra-

vaux courants se faisaient alors d'après les vieux procédés de durcissement par les liquides chromés ou bien par la méthode plus récente de l'inclusion à la gomme. En 1902, dans le livre de MANN (5), (*Physiological Histology*), la technique à la paraffine était considéré comme la méthode usuelle pour la confection des coupes.

Cependant, dès 1890, BONNEVAL (6) faisait remarquer l'altération des tissus délicats dans les bains de paraffine en fusion, et peu de temps après la découverte de GIESBRECHT, on remarque une éclosion de travaux se rapportant aux liquides fixateurs. C'est FLEMMING (7), en 1882, qui ouvre la liste, suivi par PERENYI (8), POL (9), KULCHITZKY (10), et, en 1893, par BLUM (11) qui introduit le formol, base des fixateurs usuels actuellement en usage. Tous ces auteurs avaient en vue la composition de liquides permettant aux pièces soumises à leur action de résister sans trop d'altérations aux effets nocifs des bains de paraffine. Dans les débuts de l'application de cette méthode, on avait donc remarqué qu'il fallait coaguler énergiquement les protéines des tissus traités, si on voulait obtenir de bons résultats, en un mot les fixer, terme fort peu employé avant cette époque où on utilisait les réactifs coagulants et précipitants surtout comme durcissants.

De son côté, la controverse ouverte entre SCHIEFFER-DECKER (12) et DUVAL (13) en 1888, sur les avantages respectifs du collodion et de la celloïdine, aboutit à l'adoption de cette dernière et à l'établissement de la technique encore suivie aujourd'hui. Très rapidement, on remarqua l'avantage qu'il y avait à utiliser ce procédé d'inclusion qui ne faisait intervenir aucun chauffage et par con-

séquent, altérerait beaucoup moins les tissus que les procédés à la paraffine. Mais, on en relevait les inconvénients, c'est-à-dire la lenteur des opérations, l'obligation de faire les coupes en présence d'alcool, sans laisser sécher les blocs ; l'impossibilité de faire des coupes sériées en rubans ; l'épaisseur toujours forte de ces coupes. A ces inconvénients, auxquels remédient partiellement le procédé mixte de KULCHITZKY (14) à la celloïdine-paraffine (1887) et la méthode de l'éclaircissement des blocs à l'huile de cèdre de BOLLES LIE (15) (1896), on opposait la commodité avec laquelle la paraffine fournit des coupes minces et sériées, utilisables à la fois pour les travaux anatomiques et cytologiques ; et on fermait quelque peu les yeux sur l'effet néfaste que pouvait avoir la chaleur sur les tissus au cours de leur traitement par les bains de paraffine.

A vrai dire, le problème de ces altérations hantait un certain nombre d'histologistes.

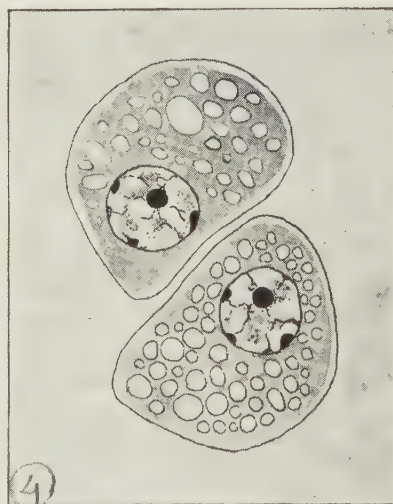
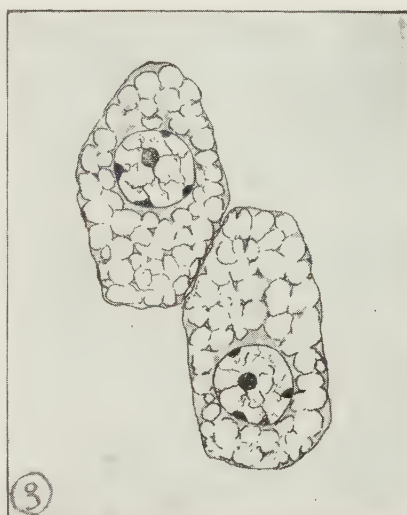
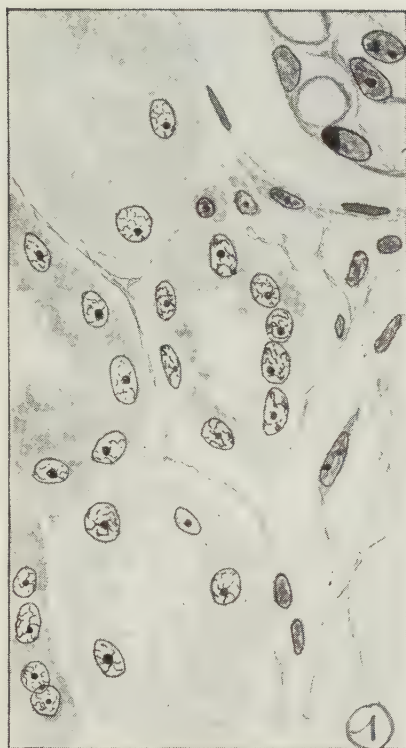
Martin HEIDENHAIN (16), en 1901, inaugurait un procédé au sulfure de carbone qui réduisait au strict minimum la durée du chauffage à 56°. Un grand nombre de méthodes concourrant au même but : réduire la durée du chauffage furent depuis imaginées, jusqu'à celle, toute récente, de PASTERNAK (17) en 1940.

Il est néanmoins curieux de constater que, pour les travaux cytologiques, la méthode à la paraffine, seule capable de fournir les coupes minces nécessaires, était la seule utilisée alors que, de toutes, c'est elle qui avait le plus de chance d'altérer les structures cytologiques que l'on se proposait précisément d'étudier.

Aussi, depuis le début du siècle, l'introduction de

PLANCHE I

1. — *Rein formol paraffine.*
2. — — — *congélation.*
3. — *Spongocytes formol paraffine.*
4. — — — *congélation.*



l'industrie des gaz comprimés donna à la méthode des coupes par congélation un essort nouveau, malgré les difficultés avec lesquelles elle fournit des sections minces, car elle semblait bien constituer la technique la moins traumatisante. En 1912, KRAUSE (17), dans son cours d'histologie, s'étend longuement sur cette méthode.

Comparons d'ailleurs nous-même, comme le montre la planche I, deux coupes d'un même organe fixé au formol et faites l'une par congélation, l'autre par la paraffine. Nous avons choisi la surrénale et le rein de Cobaye qui fournissent des exemples particulièrement démonstratifs.

La surrénale, coupée à la congélation, colorée à l'hémaloxiline ferrique, montre dans la zone corticale les spongiocytes comme des éléments polyédriques allongés à cytoplasme sombre et homogène creusé de nombreuses vacuoles claires. Ce cytoplasme forme un réseau très net dont les travées sont franchement délimitées, à sa périphérie une zone plus claire, très mince, s'étend sous la surface cellulaire, également très nettement tracée. Le noyau est sphérique, à contour très régulier, il présente quelques blocs chromatiques et un nucléole sphérique se détachant sur un suc nucléaire incolore. Entre les cellules, des espaces, la plupart du temps virtuels, parfois réels, représentent les capillaires sinusoides tapissés de cellules endothéliales discontinues aux contours également très nets.

Sur une coupe à la paraffine du même organe, colorée de la même manière, le cytoplasme des spongiocytes est plus clair et la zone claire périphérique ne se reconnaît plus ; il a pris un aspect grumeleux et ses contours

sont moins réguliers ; enfin, les cloisons cytoplasmiques qui séparent les vacuoles adipeuses sont, en mains endroits, effondrées si bien que les limites et la forme exacte de ces vacuoles sont difficiles à préciser. Les espaces intercellulaires sont ouverts et les cellules endothéliales sont fréquemment altérées. Les noyaux, par contre, ont peu souffert.

Quant aux coupes de rein, elles permettent des conclusions analogues. Après congélation, le plateau strié des tubuli contorti est parfaitement visible, les espaces conjonctifs qui séparent les tubes sont virtuels ou bien remplis d'un tissu conjonctif homogène avec un fin feutrage collagène orienté autour des tubes. On y trouve des fibroblastes dont noyaux et cytoplasme sont facilement observables. Après la paraffine, au contraire, on remarquera immédiatement la destruction de la zone apicale du tubulis concortus dont les débris encombrant la lumière ; le tissu conjonctif montre une agglomération des fibrilles en travées plus importantes formant un reticulum artificiel centré sur les divers éléments (tubes urinifères, vaisseaux, fibroblastes) et n'ayant qu'un rapport lointain avec la disposition observée sur les coupes par congélation.

L'observation de la planche I permet de se rendre compte rapidement des altérations considérables que la technique à la paraffine cause dans l'organisation des tissus et permet de conclure à la supériorité des coupes à congélation, au point de vue de la conservation morphologique des éléments histologiques.

En dépit de ces constatations, voici plus de 50 ans que la paraffine est utilisée à peu près exclusivement pour

la confection des coupes, en raison surtout de ses avantages pratiques, que nous avons énumérés plus haut. Cette méthode est utilisée depuis si longtemps qu'il semble aussi naturel de faire des coupes histologiques avec des blocs de paraffine, que de couper, à table, sa viande avec un couteau. C'est une si vieille habitude, ancrée depuis si longtemps, qu'on ne discute même plus ses inconvénients et qu'il vient rarement à l'esprit la possibilité d'autre chose.

Cependant, ne serait-il pas possible, précisément, de faire autre chose, de trouver parmi les innombrables substances nouvelles que la chimie nous a données depuis 50 ans, un produit qui permettrait de faire des coupes minces, collables sur lames, donc aussi faciles à manipuler que les coupes à la paraffine, mais ne présentant pas les altérations cytologiques que l'on relève sur ces dernières.

Les résines artificielles, dérivées de la polymérisation de corps organiques de formule $R - CH = CH^2$, nous ont paru, à la suite de la lecture d'un article de PUCKETT (19), publié en 1940, susceptibles de résoudre le problème.

PUCKETT eut l'idée d'inclure les embryons et autres objets macroscopiques, habituellement présentés aux étudiants en bocaux d'alcool, dans des blocs de résine polyacrylique durs et transparents, obtenus en polymérisant un bain d'un éther méthacrylique liquide contenant le dit échantillon. Il va sans dire que la pièce avait été déshydratée par l'alcool absolu et ensuite bien imprégnée de cet éther, de telle sorte qu'il fasse parfaitement corps avec la masse polymérisée qui le pénètre

aussi intimément que le pouvait faire l'éther méthacrylique liquide.

Des coupes par usure, faites dans de tels blocs, beaucoup trop durs pour être coupés au microtome, lui montrèrent que la masse transparente pénétrait les tissus très intimément puisqu'elle pouvait servir de milieu d'examen optique pour les coupes ainsi pratiquées et que la conservation histologique était excellente.

Nous avons cherché à réaliser des inclusions, analogues dans leur principe ; mais en utilisant une substance telle que la matière plastique obtenue puisse être aisément coupée avec les microtomes usuels. L'utilisation de l'acétate de Vinyle nous ayant donné des résultats très satisfaisants, l'objet de cet ouvrage n'est autre que l'exposé de cette technique qui fournit des coupes de 2 à 3 μ , collables sur lames, présentant une excellente conservation des détails cytologiques et même de la structure d'ensemble, car elles n'ont aucune tendance à se déchirer ou s'effriter. Il est malheureusement impossible d'obtenir des rubans sériés ; l'emploi d'une telle technique pour les travaux d'embryologie sera, en conséquence, peu indiqué.

Nous exposerons donc successivement :

1° Quelques notions sur les principes de la méthode basée sur l'étude des publications de PUCKETT.

2° La description de la technique que nous avons mise au point pour la confection de coupes histologiques par inclusion dans l'acétate de vinyle polymérisé.

3° Les preuves de l'excellente conservation des structures anatomiques et cytologiques dans les pièces soumises à cette technique, une des meilleures preuves étant la conservation sans chromage du chondriome fixé au formol, colorable sur ces coupes par une méthode rapide.

4° Nous concluerons en résumant les avantages de ce procédé, et les comparant avec les inconvénients, nous essayerons de définir les conditions dans lesquelles il nous semble avantageux de l'utiliser.

CHAPITRE PREMIER

Les principes de la méthode d'inclusion par les résines synthétiques polyvinyliques

Dans les procédés usuels d'inclusion, deux techniques se présentent, comme nous l'avons d'ailleurs déjà indiqué, pour solidifier la masse d'inclusion qui doit être nécessairement liquide au moment où se fait l'imprégnation de l'objet : soit utiliser un produit solide à froid mais facilement fusible, l'imprégnation se fera dans des bains de cette substance en fusion ; soit utiliser une solution d'un corps solide que l'on amènera à l'état solide par évaporation.

Le premier procédé nécessite, si l'on désire obtenir des masses utilisables aux températures ordinaires, l'emploi de substances fondant entre 50 et 60° ; il y aurait lieu de craindre des altérations thermiques qui commencent à se produire à 52°, température de la première coagulation des substances protéiques. Le beurre de cacao, fondant à 35°, peut être utilisé en place de paraffine et donne d'excellents résultats au point de vue

de la conservation des tissus. Mais, ce procédé, cité dans le manuel technique de Bolles Lee, Henneguy de 1896 (20), est pratiquement très délicat ; la réussite et l'établissement des coupes sont très aléatoires.

Le second procédé, utilisé dans la technique à la celloïdine, est généralement très lent. Dans ce cas, d'ailleurs, le durcissement du bloc est obtenu d'abord par évaporation lente, puis, pour éliminer les dernières traces du solvant qui seraient énergiquement retenues, on traite le bloc par un liquide dans lequel le solvant de la masse est soluble, mais non la masse elle-même : c'est l'opération de durcissement. Nous avons expérimenté des méthodes analogues avec des solutions aqueuses de gomme, et avec diverses matières plastiques en solution organique. Il est pratiquement impossible de faire des blocs par évaporation, étant donné l'énergie avec laquelle ces substances retiennent leur solvant : le centre de la masse ne durcit jamais. En appliquant le tour de main du durcissement par un liquide extrayant le solvant, nous avons pu obtenir des blocs qui ne présentaient aucun avantage sur les blocs de celloïdine et se coupaient uniquement en tranches épaisses.

Néanmoins, des pièces de 1 millimètre au plus d'épaisseur traitées par de telles solutions, puis séchées à l'air après avoir été sorties du bain d'imprégnation, prennent une consistance convenable à l'exécution de tranches minces montrant une excellente conservation cytologique. Mais la rétraction qui suit nécessairement l'évaporation des solutions d'inclusions est un obstacle au traitement, par ces techniques de tissus riches en liquide ou creusés de nombreuses cavités.

Ces procédés, excellents en principe, sont donc d'une réalisation délicate car le solvant de la matière plastique d'inclusion est difficile à éliminer totalement. Pour ne pas avoir à l'éliminer, il n'y a qu'à le supprimer et introduire la matière plastique à l'état liquide et de la durcir par polymérisation in situ.

Un grand nombre de matières plastiques dérivent, en effet, de corps de formule générale : $R-CH=CH^2$, liquides qui, en présence d'un catalyseur, le peroxyde de Benzoyle et sous l'influence de la lumière ou de la chaleur, se polymérisent en des masses solides et transparentes dont les propriétés mécaniques varient selon le produit utilisé. Le produit de départ est le monomère ; le produit solide obtenu est le polymère.

Imprégnons donc une pièce par une solution de peroxyde de Benzoyle dans un monomère approprié, portons le tout dans un moule à la lumière ou à 37° (température suffisante pour produire la réaction de polymérisation) et nous aurons réalisé une inclusion dans une matière plastique sans nous heurter aux difficultés de l'élimination d'un solvant ; le liquide d'imprégnation se transformant par son intégralité en une masse solide.

Le procédé de Puckett est justement la réalisation d'une telle technique. Il part des éthers méthyliques ou éthyliques de l'acide acrylique. Ces liquides, additionnés dans le commerce d'un antioxygène, l'hydroquinone, destiné à éviter leur polymérisation spontanée, sont débarrassés de ce phénol par agitation avec une solution de potasse, puis lavés avec de l'eau et enfin, après décantation, séchés sur du sulfate de soude anhydre. On obtient ainsi le monomère pur, qu'il faut conserver à la

glacière pour éviter sa polymérisation spontanée. D'autre part, on prépare une solution à 5 % de peroxyde de Benzol dans ce monomère pur et on chauffe au bain-marie à 85° ce liquide jusqu'à ce qu'il ait pris une consistance sirupeuse. Il constitue la masse d'inclusion proprement dite.

Les pièces, assez volumineuses puisqu'il s'agit d'échantillons de collection microscopique, sont déshydratés aux alcools, éclaircies au toluène, imprégnées de monomère pur. On remplit alors un cristalliseur de la masse sirupeuse ; la pièce y est déposée, on recouvre d'un couvercle ; un chauffage à 50°, de 24 à 36 heures, permet d'obtenir un disque de résine dure et transparente renfermant l'échantillon à conserver. Cette masse, très dure, peut être sciée, rabotée, polie, en blocs parallélépipédiques permettant, par toutes leur faces, l'examen de la pièce à la loupe binoculaire.

Puckett, d'ailleurs, fit par la méthode d'usure des coupes dans ces blocs trop durs pour être coupés au microtome et il constate sur des os ou des dents, non décalcifiés et colorés en masse avant l'inclusion, une excellente conservation des détails histologiques.

Le procédé que nous préconisons n'est autre qu'une variante de cette technique : au lieu de partir d'ester de l'acide acrylique, l'utilise comme monomère l'acétate de vinyle $\text{CH}^3\text{—CO—O—CH=CH}^2$ conduisant à des polymères moins durs et légèrement hydrophiles qui, au contact de l'eau, s'assouplissent considérablement ce qui a, comme on le verra plus loin, une grosse importance pour la confection et l'étalement des coupes.

Le processus des opérations ne diffère que peu de celui

de Puckett ; toutefois le moule ne doit pas être seulement couvert mais hermétiquement bouché. Un moule en verre ne peut convenir car le démoulage serait strictement impossible. C'est donc au sujet du moule que nous nous écarterons le plus des indications de Puckett.

Ces notions préliminaires étant exposées, nous pouvons maintenant entreprendre la description de la technique proprement dite par laquelle peuvent être réalisées de telles inclusions.

CHAPITRE II

Technique pratique des inclusions dans les résines polyvinyliques

Le procédé consiste à disposer à l'intérieur d'un moule hermétiquement clos et susceptible d'être démonté, dans un bain d'une masse d'inclusion sirupeuse constituée par de l'acétate de vinyle partiellement polymérisée, une pièce préalablement imprégnée d'acétate de vinyle monomère pur. Il y a donc trois éléments à préparer :

- La pièce ;
- La masse d'inclusion ;
- Le moule.

Préparation de la pièce.

a) *Fixation.* — N'importe quel mélange fixateur peut être utilisé sous la condition qu'il ne renferme pas d'acide picrique. Ce corps, en effet, nuit à la polymérisation qui ne s'effectue que lentement et conduit alors à des produits mous et élastiques inutilisables. Nous avons, par contre,

obtenu d'excellents résultats avec le formol salé à 10 %, neutralisé ou non ; le sublimé acétique ou trichloracétique, le Tellyesniczky ; nous n'avons pas pu expérimenter les mélanges osmiés. Le fixateur est éliminé soigneusement de la manière habituelle : eau, alcool, alcool iodé selon les cas. On prépare autant que possible pour l'inclusion des fragments dont une face au moins, celle par laquelle on entamera plus tard la coupe, sera bien plane ; résultat obtenu facilement en utilisant une lame de rasoir pour l'aviver.

b) *Déshydratation*. — La déshydratation doit être très soigneuse. L'acétate de vinyle n'est pas miscible à l'eau ; il tolère cependant l'alcool à 95° ; mais les pièces passées de l'alcool à 95° dans l'acétate de vinyle s'imprègnent mal, ensuite, de la masse sirupeuse et donnent de mauvaises inclusions. En conséquence, il faut faire une déshydratation soigneuse.

Le dioxane nous a paru être l'agent déshydratant qui conduisait aux inclusions les plus homogènes. Nous utilisons les bains de dioxane d'une durée totale de 48 heures en opérant dans des tubes à essai pour les pièces de faible volume, dans de petits bocaux pour les fragments plus volumineux.

Nous avons également utilisé, selon une technique que nous avons déjà préconisée (21) en vue de l'inclusion à la paraffine, la cyclohexanone. Dans ce cas, deux bains d'alcool à 95° et deux bains de cyclohexanone d'une durée totale de 48 heures donnèrent d'excellents résultats.

L'alcool absolu, enfin, peut être utilisé mais il ne faut

jamais passer directement une pièce de cet alcool dans l'acétate de vinyle, car les inclusions ne seraient pas homogènes. On utilisera trois bains d'alcool absolu et un bain de toluène ; le tout en 48 heures.

Nous conseillons fortement l'emploi du dioxane qui nous paraît constituer la méthode de déshydratation de choix en vue de ces inclusions.

c) *Impregnation*. — La pièce, traitée par une des techniques précédentes, est imprégnée par de l'acétate de vinyle monomère pur, débarrassé par distillation, — comme on le verra plus loin (page 32) à propos de la confection de la masse d'inclusion, — de l'hydroquinone dont on l'additionne pour le conserver. Nous utilisons deux bains successifs en tubes à essai ou en bocaux, selon le volume de l'objet, bains d'une durée totale de 24 heures. Il faudra veiller avec soin à préserver de la chaleur et de la lumière les récipients renfermant ces bains d'acétate de vinyle pur afin d'éviter la polymérisation spontanée de leur contenu. On se trouvera bien de faire traverser leur bouchon par un tube capillaire fin, la polymérisation, dans ce cas, sera impossible car la pression ne saurait s'élever à l'intérieur du récipient ainsi mis en communication avec l'atmosphère extérieure. En effet, aux températures ordinaires, la polymérisation ne peut se faire que si la pression d'oxygène atteint une valeur assez élevée, ce qui est impossible avec ce dispositif. Par ailleurs, la perte par évaporation au travers du tube capillaire est pratiquement négligeable. Les pièces à la fin du second bain d'acétate de vinyle pur, sont prêtes pour l'inclusion proprement dite.

Préparation de la masse d'inclusion.

La masse d'inclusion est une solution à 3 % de peroxyde de benzoyle dans de l'acétate de vinyle pur, partiellement polymérisé par chauffage à l'ébullition sous un réfrigérant ascendant. La nécessité de cette polymérisation partielle préalable provient de ce que, à la température de 37° la réaction de polymérisation de l'acétate de vinyle est précédée d'une phase d'induction pendant laquelle la pression s'élève dans le vase où l'on opère. Ce n'est que lorsque la pression atteint une valeur que nous dénommerons pression critique, que la polymérisation se déclenche pour se continuer, même si à ce moment on ouvre le récipient. Il en résulte que la réaction, en partant de la solution simple, non épaissie, ne peut se faire que dans un vase rigoureusement clos où la pression peut s'élever lentement jusqu'à la valeur critique. Au contraire, en partant d'une solution déjà polymérisée partiellement, la phase d'induction est supprimée et d'étanchéité du récipient où l'on opérera ne devra plus être aussi rigoureuse ; de plus, l'orientation des pièces dans un liquide épais est plus aisée que dans l'acétate de vinyle qui est un liquide très mobile et la conservation de cette orientation lorsqu'on porte les moules à l'étuve est beaucoup plus facile.

Pour préparer cette masse d'inclusion, on commence par préparer par distillation à partir de l'acétate de vinyle stabilisé par l'hydroquinone, de l'acétate pur débarrassé de son antioxygène ; puis après avoir ajouté une quantité voulue (3 %) de peroxyde de benzoyle

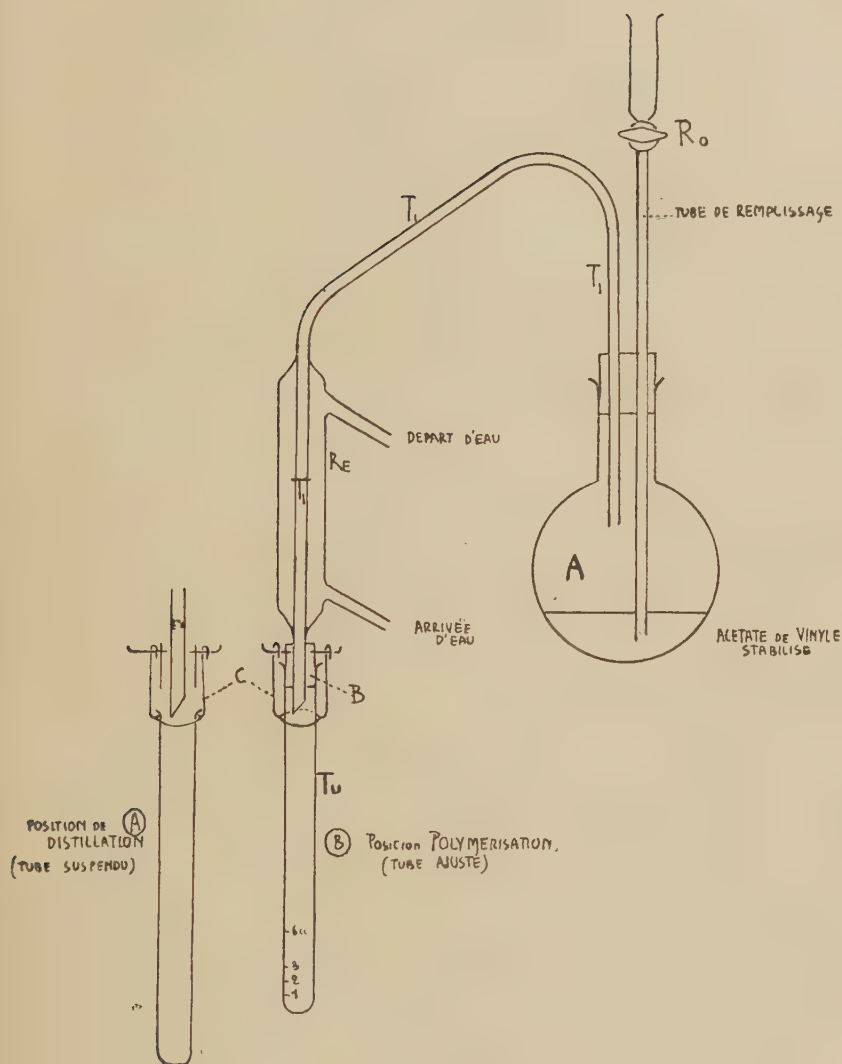


FIGURE 1.

*Appareil à distillation
pour la préparation de la masse d'inclusion.*

comme catalyseur, à polymériser par ébullition sous réfrigérant ascendant l'acétate pur ainsi obtenu, jusqu'à ce que sa consistance devienne sirupeuse.

L'appareil représenté sur la figure 1 nous permet de faire rapidement, et en utilisant le même réfrigérant pour les deux temps, cette double opération.

Un ballon A, de 250 cc. contient 50 à 100 cc. d'acétate de vinyle stabilisé par l'hydroquinone à 5 pour 1.000. Son bouchon, en liège fin, est traversé par un tube entonnoir à robinet Ro et par un tube T₁, qui se recourbant pour devenir descendant, traverse un réfrigérant Re de 15 cm. de long environ, puis un bouchon B, de liège, pour se terminer à 1 ou 2 cm. au-dessous de ce bouchon par une extrémité biseautée. Un tube à essai Tu, porteur d'une graduation gravée en centimètres cubes, peut s'adapter au bouchon B ou bien se suspendre par un dispositif en fil de fer à ce même bouchon.

Pour distiller, on chauffe le ballon A après avoir mis le tube Tu en position de suspension et avoir fait passer le courant d'eau dans le réfrigérant. Le liquide distillé, recueilli dans le tube Tu est d'abord un peu louche, car il entraîne au début un peu d'humidité. Dès que le liquide passe clair, on vide tout le distillat qui a passé jusque là dans l'entonnoir du ballon et on ouvre le robinet Ro pour le faire repasser dans le ballon. On continue la distillation après avoir refermé Ro et on recueille alors la quantité nécessaire d'acétate de vinyle pur que l'on apprécie au moyen de la graduation du tube. (Pour les moules de la dimension que nous indiquerons, il faut compter 1 cc. pour confectionner un bloc). On arrête la distillation à ce moment, et on vide dans Tu la quantité nécessaire de

peroxyde de benzoïle, c'est-à-dire 3 cgr. pour 1cc. de liquide. Après avoir adapté Tu au bouchon B, on chauffe doucement ce tube pour entretenir l'ébullition douce de son contenu ; un chauffage très léger est suffisant ; on l'obtiendra avec un bec Bunsen réglé bas tenu à la main, dont on approchera de temps à autre la flamme du tube. Quand la consistance est devenue analogue à celle de la glycérine, ce que l'on apprendra vite à juger d'après la vitesse d'ascension des bulles dans le liquide bouillant, on arrête le chauffage et on refroidit rapidement le tube en soufflant dessus ; puis, quand l'ébullition est arrêtée, on le trempant dans de l'eau quelques instants. En attendant d'utiliser la masse ainsi préparée, on réadapte le tube Tu au bouchon B de manière à éviter que l'appareil, ouvert à l'air, ne se charge d'humidité. On notera qu'entre deux opérations, il faut laisser l'appareil bien fermé, c'est-à-dire muni d'un tube bien adapté au bouchon B.

La masse ne doit pas être préparée longtemps à l'avance, car elle se polymérise et épaisse rapidement, surtout à la lumière et à la température usuelle. Personnellement, nous préparons au moment de l'inclusion juste la quantité voulue ; l'opération ne dure d'ailleurs qu'une dizaine de minutes et l'appareil monté et garni d'acétate de vinyle stabilisé est toujours prêt à fonctionner.

Quand, après un certain usage, la quantité d'acétate stabilisé dans le ballon A devient insuffisante, on regarnit l'appareil par l'entonnoir à robinet d'une nouvelle dose de monomère stabilisé. Après 5 ou 6 remplissages, la concentration en hydroquinone se trouve ainsi augmentée dans le ballon A. Avant de faire un nouveau rem-

plissage, on le nettoiera. De la sorte se trouvera évitée l'élévation excessive du taux d'hydroquinone dans le ballon.

Tout le stock d'acétate de vinyle dont on dispose sera donc conservé, additionné de 5 % d'hydroquinone aussi longtemps qu'on le désire. L'appareil que nous venons de décrire sera utilisé pour préparer la masse d'inclusion, on s'en servira également pour distiller le monomère pur non stabilisé destiné à garnir les batteries d'imprégnation, comme nous l'avons dit plus haut.

Préparation du moule.

La polymérisation ne pouvant réussir que dans un récipient hermétiquement clos, nous avons d'abord essayé d'utiliser à cette fin des tubes de verre ; mais le démoulage était pratiquement impossible. Après de nombreux essais, nous fûmes amené à utiliser un tube de cellophane fermé à chaque extrémité par un bouchon, le tout étant assujéti par de la gomme. Avec ce dispositif, le démoulage se fait très simplement par immersion de l'ensemble dans de l'eau.

Nous décrirons ici la fabrication d'un moule de 1 cc. permettant l'inclusion de pièces de 8 millimètres sur 8 environ, d'une épaisseur de 3 à 4 mm. au plus. Toutes les indications de volume ou de dimensions que nous donnerons, par la suite, se rapportent à de tels moules : mais il est bien évident que rien ne s'oppose à la confection de blocs plus volumineux.

Selon les indications de la figure 2, on commencera par préparer des cylindres de cellophane en roulant autour

d'un tube à essai de 14 mm. une bande de 2 cm. de haut sur 6 de large de cellophane, épaisse (épaisseur 0,1 mm. marque La Cellophane-Bezons). Si on ne dispose pas de cellophane épaisse, on utilisera la cellophane mince à confitures en prenant des bandes plus longues, dont on

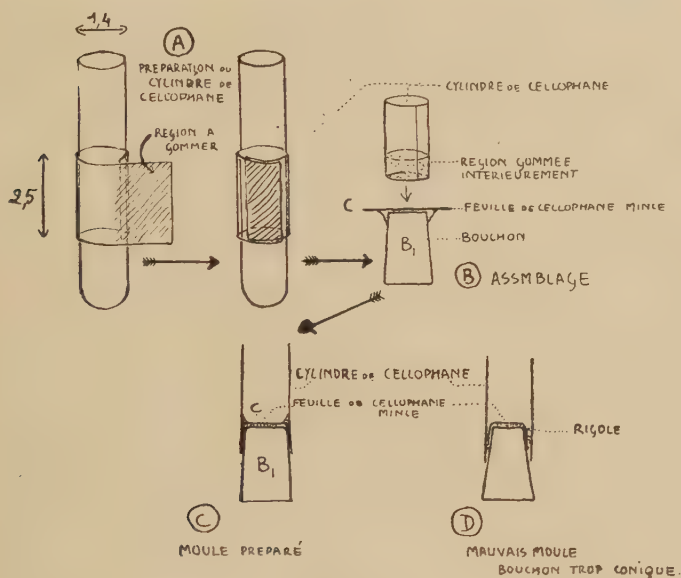


FIGURE 2.

Confection des Moules (cotes en centimètres).

fera plusieurs tours ; mais les manipulations seront moins aisées et le résultat moins bon. Le joint de ce cylindre sera collé avec une solution de gomme épaisse ; on assurera une bonne adhérence en passant plusieurs fois le doigt sur le joint (fig. 2 a) jusqu'à ce que la gomme, en se séchant, l'empêche de glisser. On fera alors sortir le tube du cylindre de cellophane.

Le fond des moules sera constitué par un bon bouchon de liège fin B₁ (voir figure 2 b) que l'on enfonce après l'avoir enduit de la solution de gomme dans une extrémité du tube, encollée elle aussi. Avant de l'enfoncer, on dépose sur sa surface une rondelle de cellophane mince C, dépassant ses bords de 5 millimètres environ. Lorsque le bouchon pénètre dans le tube, les bords de la feuille C sont pris entre lui et le tube et cette feuille se trouve fortement tendue sur la surface du bouchon pour constituer au moule un fond bien plat et bien régulier (figure 2 c). Il faut choisir un bouchon d'un diamètre tel qu'il pénètre de 6 à 7 millimètres dans le tube et pas trop conique, de telle sorte qu'il colle vraiment au cylindre sur toute cette hauteur. Les bouchons trop coniques donnent, en effet, une petite rigole circulaire autour du fond du moule (figure 2 d).

La présence de cette feuille mince de cellophane au fond du moule est la meilleure garantie contre la formation de chapelets de bulles. Ces chapelets, en effet, prennent naissance à partir des petites aspérités que peut présenter le moule. En opérant dans un moule fait comme il vient d'être indiqué, on aura quelques bulles périphériques qui, à l'inverse des bulles centrales, ne gêneront nullement la confection des coupes.

Confection du bloc.

Dans un moule préparé comme il vient d'être dit, on videra environ 1 cc. de masse d'inclusion sirupeuse et on y déposera la pièce sortant du dernier bain d'acétate de vinyle pur *exempt d'hydroquinone*. On orientera la pièce

en disposant la face plane sur le fond du moule. Si elle a tendance à surnager dans la masse, on attendra un moment qu'elle s'en pénètre ; on pourra alors la disposer au fond où elle restera définitivement. Il faudra ensuite boucher avec un bon bouchon B_2 , enduit de gomme, l'ori-

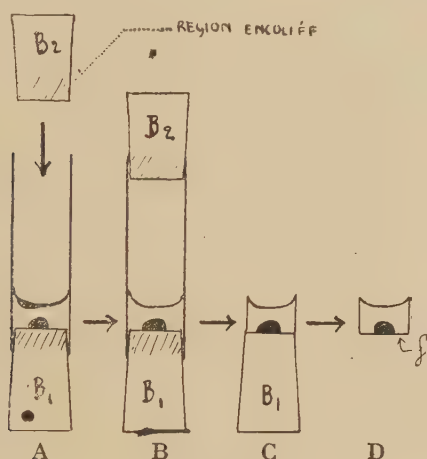


FIGURE 3.
Préparation du Bloc.

- A. — Moule garni de la Pièce. Bouchage.
- B. — Le Moule pendant la Polymérisation.
- C. — Après la désagrégation du Moule par l'eau.
- D. — Séparation du Bloc et du Bouchon.

fice supérieur du moule en opérant avec précaution afin de ne pas déplacer la pièce.

Avant de porter à l'étuve pour la polymérisation, on laissera le joint du bouchon supérieur sécher 1 à 2 h.

La polymérisation de la masse se fera simplement par un chauffage de 48 heures à 37° suivi d'un chauffage à

56° de 48 heures à 3 jours. Après le premier chauffage, elle doit être solide et ne pas couler si on incline le tube, sinon c'est qu'il y a vraisemblablement une fuite dans le moule ; dans ce dernier cas, on ouvrira l'appareil pour récupérer la pièce et recommencer dans un nouveau moule.

Lorsque les deux chauffages sont terminés, il faut laisser refroidir, puis faire séjourner le tube de cellophane 30 à 60 minutes dans l'eau. On le démontera facilement pour isoler le bloc qui reste cependant adhérent au bouchon (fig. 3 c). Avec un scalpel, on séparera le bouchon du bloc (fig. 3 d) ; on raclera sur la face f du bloc ainsi libérée les parcelles de bouchon qui peuvent y rester ; il sera inutile d'essayer d'enlever les restes de la feuille de cellophane mince qui reste adhérente au polyvinyle. Cette face, qui est parfaitement plane, sous laquelle — à une faible profondeur — se trouve la face plane de la pièce est celle par laquelle on entamera le bloc.

On laissera sécher, puis on collera l'autre face, concave (car elle représente la surface libre du liquide) avec de la colophane fondue sur un petit bloc de bois dur, ou mieux de contreplaqué à 5 épaisseurs, moins sujet à se déformer lorsqu'on le saisira dans la pince du microtome. La déformation du socle risquerait, en effet, de fissurer la colophane et, en conséquence, de décoller le bloc. Pour cette raison, le bloc de bois ordinaire ne pourra être saisi (fig. 4) que par les faces f_1 et f_2 perpendiculaires aux fibres du bois. Etant donné la disposition des microtomes, c'est parallèlement à ces fibres que se feront les coupes, dans la direction d_1 et d_2 . Pour faciliter, comme on le

verra plus loin, l'étalement des coupes, il faudra que la plus grande des marges laissées autour de la pièce soit disposée comme le montre la fig. 4. Dans ces conditions,

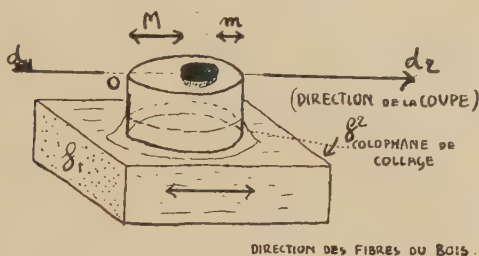


FIGURE 4.

Bloc terminé et monté correctement sur Socle de bois dur.

c'est par le point 0 que le rasoir devra rencontrer le bloc, c'est-à-dire qu'il coupera successivement la grande marge M , la pièce, la petite marge m .

Influence de divers facteurs sur la marche de la polymérisation.

L'étanchéité du moule est un facteur de première importance. Nous avons déjà exposé cette question pp. 27 et 28.

Le fixateur ne devra pas contenir d'acide picrique ; ce corps inhibe la polymérisation et rend la masse élastique et incoupable.

La pièce ne devra pas être trop volumineuse : environ le 10^e du volume total du bloc, ce qui correspond — dans les moules décrits — à un fragment de $10 \times 5 \times 2$ mm. Il faudra, si l'on désire inclure des fragments plus volu-

mineux, faire des blocs plus gros. Une pièce trop volumineuse pour le volume total du bloc, rend la masse molle et élastique, inutilisable pour la confection des coupes. Certains organes, comme le foie, ont d'ailleurs une action plus marquée en ce sens que d'autres.

Il ne doit pas y avoir de bulles ailleurs que dans la zone périphérique du bloc ; les bulles centrales proviendraient de petites aspérités du fond du moule qui ne doivent pas exister si le bouchon est de bonne qualité et la feuille de cellophane mince, bien tendue.

Si toutes les précautions indiquées sont prises, on obtient des blocs cylindriques, durs et transparents qui, une fois collés sur leur socle de bois, ont l'aspect représenté à la fig. 4. Ces blocs peuvent se conserver indéfiniment avant d'être coupés, opération dont l'étude fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III

La confection des coupes

On utilisera, pour couper les blocs de polyvinyle, un microtome de Minot, bien réglé et deux lames : l'une usée, servira à entamer le bloc et sera réservée à cet usage ; l'autre, très fine et parfaitement entretenue, servira à faire les coupes une fois le bloc entamé.

Le bloc sera saisi par les deux faces f_1 et f_2 de son socle dans la pince du microtome ; on ne le saisira pas entre les deux autres faces car ce socle pourrait se déformer, la colophane se briser et le bloc se décoller.

On assujettira le rasoir d'entame dans une position assez inclinée et on coupera lentement, à $10\ \mu$, jusqu'au moment où on arrivera sur la pièce. Il faut absolument éviter de vouloir faire cette opération trop rapidement (ne pas tourner à plus d'un tour par seconde, d'un mouvement très régulier). Les microtomes démultipliés seront particulièrement pratiques. Si on tournait rapidement, le rasoir ne mordrait que toutes les 5 ou 6 coupes, en

enlevant une tranche volumineuse ; les efforts violents alors exigés pourraient détériorer la lame et décoller le bloc.

Cette opération enlève des copeaux qui ne représentent pas toute la surface du bloc ; on ne s'en inquiètera pas. Pour obtenir des sections entières, il faut, en effet, ramollir la surface du bloc avec l'haleine. Le polyvinyle hygroscopique absorbe un peu d'humidité, devient souple et se coupe sur toute la surface sans se déchirer. C'est ce qu'on fera lorsqu'on estimera être arrivé au niveau de la pièce ; en examinant la coupe épaisse ainsi obtenue, on vérifiera si la section intéresse bien l'objet. Si oui, on change de rasoir pour faire les coupes proprement dites.

L'épaisseur des coupes sera alors réglée à 5 μ , et on recommence à couper, très lentement ; entre chaque coupe, on projette l'haleine sur la surface du bloc : la coupe doit ensuite se faire régulièrement, sans à coup, ni bruit de caclage ; elle se plisse sur la face antérieure du rasoir. Il faut, avant de l'enlever, la déplier. De la main droite, on prend une petite pince à mors fins et de la main gauche une aiguille. A l'aide de ces deux outils, on abaisse le bord inférieur de la coupe vers le dos du rasoir ; l'étalement se fait alors sur la face de la lame. Avec la pince on la saisit et la dépose à la surface de l'eau contenue dans un cristallisoir où elle flotte et s'étale complètement.

On resaisit la manivelle du microtome pour faire remonter le chariot. En haut de la course, on donne un coup d'haleine sur le bloc et on abaisse lentement et régulièrement pour faire la coupe suivante. On aban-

donne la manivelle pour étaler et recueillir cette nouvelle coupe, et ainsi de suite.

Les coupes recueillies sur l'eau seront collées sur lames albuminées d'une manière très simple. La lame sera recouverte d'une goutte d'albumine glycerinée bien étalée avec le doigt, puis trempée dans un verre d'eau. En la plongeant ensuite partiellement dans le cristallisateur où flottent les coupes, il sera très facile d'en faire passer une sur la face albuminée. On égoutte et on sèche sur la platine chauffante électrique.

Les coupes peuvent d'ailleurs être conservées à l'état sec indéfiniment, sans être collées. Pour cela, on les porte après étalement, du rasoir sur un velours. Lorsqu'on en a un certain nombre, on les met dans une petite boîte que l'on conserve dans un endroit sec et frais. Au fur et à mesure des besoins, on prendra ces coupes avec une pince et on les déposera sur une lame albuminée et recouverte de quelques gouttes d'eau. En 10 à 15 minutes la coupe est parfaitement étalée ; on égoutte et on sèche sur la platine chauffante, comme ci-dessus. Cette manière de faire permet de conserver longtemps des coupes toutes faites, en grand nombre, sans immobiliser les lames correspondantes.

Les coupes, une fois collées et séchées, peuvent se conserver indéfiniment dans cet état. Au moment de la coloration, on commencera par dissoudre la masse d'inclusion avec un solvant quelconque (Toluène, dioxane, cyclohexanone ou même simplement alcool à 95°). Cette dissolution est plus lente que celle de la paraffine : on laissera les coupes 1/4 d'heure au moins dans le tube où se trouve le dissolvant. Ensuite, on rincera par deux

alcools (un seul, si le dissolvant est de l'alcool ou du dioxane) pour éliminer le dissolvant avant de passer dans l'eau.

La suite des opérations de coloration et de montage s'effectueront comme sur des coupes à la paraffine.

Les principaux insuccès et leurs causes.

Il arrivera parfois que les coupes se feront mal. Voici donc exposés les principaux incidents que nous avons pu constater et auxquels nous pouvons remédier facilement dans la plupart des cas.

1° La coupe est partielle, elle n'intéresse pas toute la surface du bloc dont elle ne constitue qu'un copeau. Il y a à cela deux causes essentielles : on ne fait pas agir assez l'haleine, ou le rasoir n'attaque pas le bloc par sa tranche mais tangentiellement par surface ; dans ce dernier cas, on continuera de couper jusqu'au moment où le rasoir entamera par la tranche. Les coupes alors, se feront normalement.

2° La coupe se plisse exagérément, les plis se collent entre eux, on ne peut l'étaler sans la briser.

Causes : a) On fait trop agir l'haleine. La couche superficielle est alors trop molle et les bords des plis se collent.

b) Le bloc n'est pas assez polymérisé ; le séjour à 56° a été insuffisant ou bien des impuretés, introduites accidentellement, ont troublé la marche de la polymérisation. Dans ce cas, on pourra essayer de refroidir le bloc à la

glacière, 24 heures, dans un flacon bien bouché renfermant quelques morceaux de chlorure de calcium.

c) Le rasoir ne coupe plus.

3° On entend un bruit de raclage ; la coupe présente des zones alternativement épaisses et minces correspondant aux vibrations du rasoir, ou même se rompt suivant des lignes correspondant aux zones minces lorsqu'on cherche à l'étaler.

Causes : a) On ne fait pas agir assez l'haleine.

b) Le rasoir est trop incliné.

c) Le bloc est trop dur, la polymérisation a été trop poussée. Il n'y a alors rien à faire.

4° Il ne se fait qu'une coupe sur deux ou trois ou bien il y a alternance d'une coupe épaisse et d'une coupe mince.

Causes : a) Le bloc n'est pas assez polymérisé ; il est élastique et se laisse refouler par le rasoir.

b) Le rasoir n'est pas assez incliné.

c) Les glissières du microtome ou bien sa vis micrométrique ont du jeu.

5° La coupe présente des stries ou des déchirures longitudinales.

Causes : Le rasoir est ébréché. On remarquera que les plis se collent souvent au niveau des stries et que l'étalement peut être, dans ce cas, très laborieux, ou même impossible.

6° La pièce se sépare de la masse au moment où se fait l'étalement, la pièce se déchire.

Cause : Déshydratation insuffisante ; la masse d'inclusion pénètre mal. Ne pas raccourcir les temps indiqués ; vérifier que le dernier dioxane est bien anhydre.

Tels sont les quelques incidents qui peuvent interrompre la confection des coupes. Il sera souvent facile d'y remédier. C'est généralement une question de réglage de l'inclinaison du rasoir et d'intensité dans l'action de l'haleine sur le bloc avant la confection de la coupe. Normalement, on doit toujours arriver, en combinant ces deux facteurs, à couper un bloc correctement fait selon les indications que nous avons données.

Lorsqu'on sera parvenu à faire des coupes régulières de 5 μ , on essaiera de diminuer progressivement l'épaisseur et, dans les cas favorables, on pourra descendre ainsi jusqu'à 2 μ .

Telle est la réalisation pratique que nous avons mise au point d'un procédé d'inclusion histologique dans l'acétate de vinyle polymérisé. Cette technique est, assurément, plus longue et plus complexe à mettre en œuvre qu'une simple inclusion à la paraffine. Mais, dans un certain nombre de cas, elle présente sur cette dernière méthode des avantages considérables qui, dans ces cas, justifieront amplement son usage.

Il nous reste donc à exposer ces avantages en essayant

de les expliquer et ce faisant à dégager les indications à l'emploi de cette méthode.

Mais auparavant, nous résumerons ici rapidement l'ensemble des opérations :

1° Déshydrater par 4 bains de dioxane d'une durée totale de 48 heures.

2° Imprégner par 2 bains d'acétate de vinyle d'une durée totale de 24 heures.

3° Préparer la masse d'inclusion en faisant bouillir jusqu'à consistance sirupeuse, sous réfrigérant ascendant, une solution à 3 % de peroxyde de benzoyle dans l'acétate de vinyle.

4° Déposer avec cette masse la pièce dans un moule hermétique de gomme et de cellophane : chauffage à 37° 48 heures, à 56° 48 heures également.

5° Démouler, coller sur un socle avec de la colophane. Couper au microtome Minot.

6° Etaler les coupes en les faisant flotter sur de l'eau ; les recueillir sur lames albuminées, sécher sur la platine chauffante.

CHAPITRE IV

Avantages du procédé d'inclusion dans les résines polyvinyliques

La technique ainsi décrite est, certes, plus compliquée que la méthode usuelle à la paraffine ; de plus, elle ne permet pas, dans l'état actuel tout au moins, la confection — si commode avec cette dernière substance — de rubans de coupes sériées. Elle ne saurait donc constituer un procédé de travail courant destiné à remplacer la paraffine. Ce sont précisément ces précieux rubans qui ont entraîné l'adoption universelle de la paraffine et c'est à cause d'eux que l'on a passé sur les inconvénients majeurs de cette technique tels que les altérations et la rétraction dues à la chaleur. Aussi nous semble-t-il toucher ici le point faible de notre procédé.

Ceci dit, dans un certain nombre de cas cependant, elle présente certains avantages qui en indiquent l'emploi. Pour en justifier l'usage, il faut montrer qu'elle possède

sur la paraffine un certain nombre d'avantages. Ces avantages sont de deux sortes :

1° Elle permet de couper mince des objets qu'il est fort difficile de débiter après inclusion dans la paraffine, tels les organes très fibreux (gésier, cancer du sein) de consistance irrégulière (oreille interne) ; et les coupes ainsi obtenues n'ont aucune tendance à se déchirer et à se disloquer.

2° Les altérations cytologiques que peuvent causer les bains de paraffine sont totalement éliminées ; l'aspect des coupes est identique pour la conservation des structures à celui des coupes par congélation.

Nous dirons que les premiers sont d'ordre mécanique, les seconds étant d'ordre micrographique.

Avantages d'ordre mécanique.

La possibilité de faire dans des objets très durs ou de consistance irrégulière des coupes fines, n'ayant aucune tendance à la dislocation, est le résultat de la dureté de la masse d'inclusion. La coupe sera donc solide et de la pénétration parfaite de la masse dans la pièce résulte une excellente contention des éléments anatomiques.

Un milieu solide ne peut, en effet, pas jouer un rôle de soutien efficace si, comme c'est fréquemment le cas pour la paraffine, il se trouve être moins dur que les éléments qu'il s'agit de couper. Ces éléments transmettent en effet à la masse les pressions que le rasoir exerce sur

eux pour les trancher ; cette pression est d'autant plus forte que l'objet est plus dur et si elle devient trop importante, la masse peut se déformer et, en conséquence, la coupe se disloquer.

La paraffine n'est pas élastique ; l'acétate de vinyle l'est. Déformé, il tend à reprendre ses dimensions préables dès que les forces cessent d'agir. En conséquence, il ne peut se tasser sous le rasoir comme le fait la paraffine qui, déformée par l'outil, ne reprend pas sa forme antérieure. Avec cette dernière substance, en effet, les objets inclus ont souvent une élasticité notable alors que celle de la masse est nulle ; il en résulte une différence de comportement devant le rasoir, entre l'objet et la masse, le premier se tassant moins que la seconde. Le résultat est généralement, avec les organes durs et élastiques, une tendance marquée de l'objet à se séparer de la masse ou tout au moins la formation de plis qui n'intéressent que la partie objet de la coupe. Ces plis, qui ne peuvent souvent être réduits que par section des marges de paraffine, sont encore une cause de dislocation à l'étalement.

Les plis qui se forment sur les coupes au polyvinyle intéressent, au contraire, toute la largeur de la section, portant avec une égale amplitude sur l'objet et sur la masse : ils sont donc aisément réductibles. Ils ne se produisent, d'ailleurs, que parce que le début de la coupe ne glissant pas bien sur la lame, les portions suivantes se déversent par dessus. En tirant sur la partie initiale de la section, on réduira donc entièrement ces plis. Cette égalité de comportement devant le rasoir de la masse et de la pièce traduit donc une égalité dans les propriétés

mécaniques de ces deux régions du bloc. La dureté de la masse étant en effet considérable, la présence de l'objet ne modifie que peu cette dureté ; il en va de même pour l'élasticité.

Mais un autre facteur joue également pour donner aux coupes une solidité considérable.

Examinons, en effet, avec un objectif à sec fort, une coupe au polynivyle collée sur lame mais non débarrassée de sa masse d'inclusion. Nous ne verrons, aux limites de l'objet et de la masse, autour des cellules, aucune de ces lignes de diffraction qu'une coupe à la paraffine montre dans ces conditions, indice d'une hétérogénéité de structure à ce niveau. Une coupe d'un objet coloré en masse peut fort bien être examinée ainsi, la masse d'inclusion servant de milieu de montage. Nous pouvons donc démontrer ainsi que cette masse pénètre parfaitement l'objet jusque dans ses moindres détails, sans aucune discontinuité, à l'inverse de la paraffine.

Les divers éléments qui n'avaient aucune raison de se séparer lors de l'action du rasoir, en vertu de leur comportement mécanique analogue, n'auront aucune tendance à le faire ensuite, lors de l'étalement, en raison de la cohésion parfaite de la masse et de l'objet.

Pour toutes ces raisons, l'exécution de coupes minces et non disloquées des objets réputés les plus difficiles sera aisée si on fait appel à ce procédé d'inclusion.

Avantages d'ordre micrographique.

Ces avantages d'un autre ordre que les précédents, tirent leur origine dans le fait que la chaleur ne peut

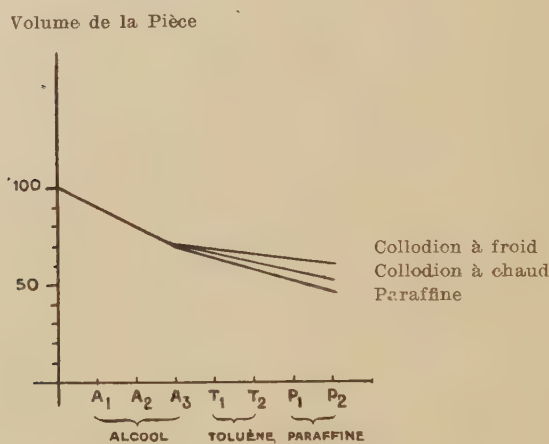
exercer d'action nocive sur les tissus inclus dans l'acétate de vinyle polymérisé.

Comme on l'a remarqué, la polymérisation se fait d'abord à 37°, température incapable de causer aux tissus le moindre dommage. Ce n'est que lorsque la solidification est obtenue que l'on chauffe à 56°. Le chauffage se fait donc sur des éléments solidement et étroitement emprisonnés dans une masse solide qui, les pénétrant parfaitement, empêche toute déformation. On peut d'ailleurs obtenir des blocs coupables en ne polymérisant qu'à 37°, à condition de faire durer l'opération 10 jours. Or, ces blocs ne sont pas meilleurs, cytologiquement, que ceux obtenus par le procédé plus rapide des deux chauffages et, en outre, sont plus élastiques, plus difficiles à couper. De plus, des coupes collées sur lames et non débarassées de leur masse peuvent être chauffées à 140° pendant 6 heures, sans manifester (après coloration) d'altérations notables par rapport à des coupes témoins du même objet. On peut donc considérer que les altérations de chauffage sont pratiquement supprimées, bien que le deuxième temps de la polymérisation s'effectue à une température égale à celle à laquelle se font les inclusions à la paraffine.

Les variations de volume en cours d'inclusion sont moins marquées qu'avec la paraffine et surtout se montrent à peu près égales sur les divers éléments constituant les coupes.

Suivons les variations de volume au cours de la technique d'inclusion de petits fragments d'organes en en mesurant au micromètre oculaire avec un faible grossissement, les dimensions à la fin de chaque bain. Le vo-

lume étant considéré comme le cube de la moyenne des dimensions mesurées, ses variations seront ainsi aisément déterminées. Une telle technique avait été utilisée par Stowell R. E. (21) qui avait de la sorte étudié le volume du parenchyme rénal (fixé au formol) au cours des techniques d'inclusion à la paraffine et à la celloïdine

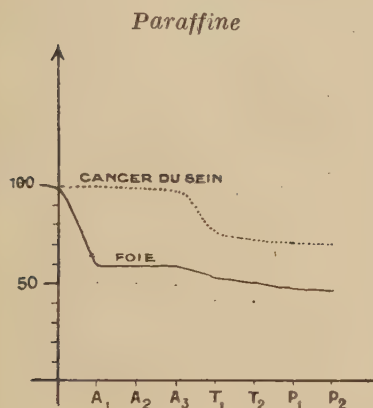


GRAPHIQUE I

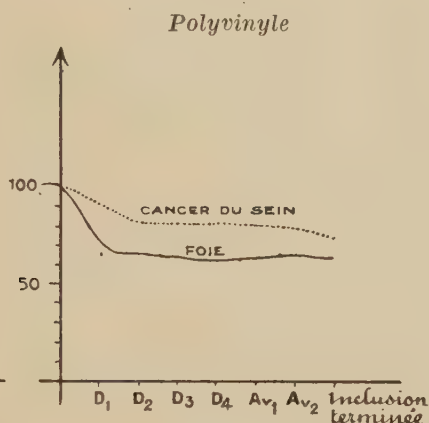
par la technique usuelle à froid et par la méthode à chaud. En ramenant le volume du tissu à 100 au sortir du fixateur, voici la courbe qui résume ses mesures. (graphique I).

On remarquera que le collodion à froid ne donne qu'une réduction du volume à 60 % de sa valeur initiale, alors que la paraffine contracte beaucoup plus ; la méthode à la celloïdine à chaud ayant une action presque aussi importante que celle de la paraffine.

Nous avons refait les mêmes expériences avec deux organes différents : du parenchyme hépatique et un cancer squirieux du sein, constitué par du tissu fibreux presque pur, traités par la paraffine d'une part, par le polyvinyle d'autre part.



GRAPHIQUE II



GRAPHIQUE III

Les graphiques II et III, ci-dessus, montrent que par la paraffine la rétraction du parenchyme est notablement plus forte que celle du tissu fibreux alors que cette différence est beaucoup moins accentuée par notre procédé. Il en résulte que la séparation, si fréquemment observée sur les coupes à la paraffine, des épithéliums d'avec leur chorion, n'est ici que rarement constatée.

L'examen microscopique des coupes ainsi obtenues confirme d'ailleurs ce que nous venons de dire : l'examen des préparations obtenues par ce procédé ne montre aucune des altérations que nous avons décrites à propos des coupes à la paraffine et se trouve sensiblement iden-

tique à celui des coupes par congélation, comme on pourra d'ailleurs s'en convaincre aisément en comparant la planche II représentant un rein et une surrénale traités par notre méthode, avec les figures de la planche I. La conservation des détails cytologiques après coloration par l'hématoxyline ferrique se révèle excellente ; on remarquera notamment que le chondriome prend légèrement l'hématoxyline ferrique, bien que les pièces n'aient pas été chromées.

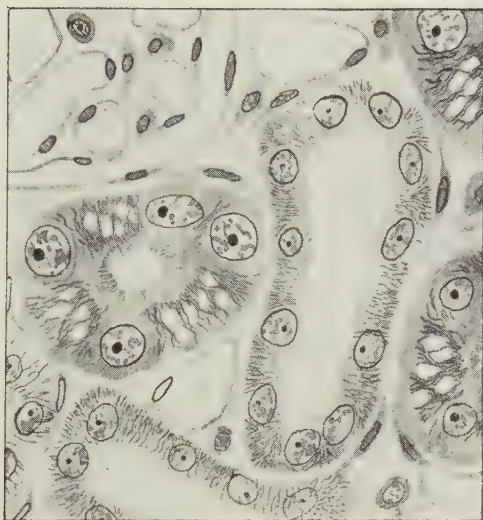
Autres avantages de l'inclusion au polyvinyle.

L'adhérence de la coupe à la lame est profonde et le décollement au cours d'opérations de coloration est exceptionnel.

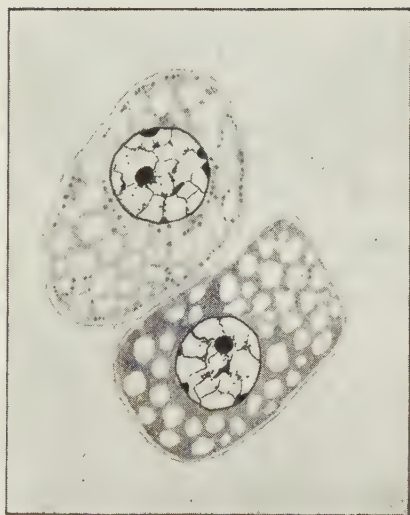
La microincinération de telles coupes est facile et ne s'accompagne pas de rétractions ni de décollements, que ce soit sur lames de verre ou sur lames métalliques. En effet, la résine se décompose sans fondre à une température assez élevée, au moment où se produisent les rétractions elle est encore solide et empêche tout mouvement notable des éléments rétractiles.

Enfin, et ceci est un avantage de grosse importance qui fera l'objet du dernier chapitre de cet ouvrage, le chondriome est conservé intact sur les coupes au polyvinyle après une simple fixation au formol sans aucune chromisation. Légèrement colorable par l'hématoxyline ferrique il prend très électivement une hématoxyline phosphomolybdonickelique, selon une technique que nous décrirons plus loin.

PLANCHE II



REIN



SPONGIOCYTES

Fixation : Formol sale neutre à 10 %.

Inclusion : Polyvinyle.

Coloration : Hématoxyline ferrique.

Disons donc, pour terminer, que l'excellente conservation cytologique des tissus traités par notre méthode et la facilité avec laquelle des coupes minces peuvent être obtenues dans des tissus durs ou hétérogènes, nous paraissent des avantages suffisants dans bien des cas pour compenser la plus grande complexité qu'elle présente sur la technique à la paraffine. Les indications à son emploi s'imposeront d'elles-mêmes : études cytologiques, anatomie pathologique fine, et même lorsque les objets se prêtent mal aux coupes à la paraffine, travaux d'anatomie microscopique. Elle ne saurait, bien entendu, constituer une méthode courante de travail et son usage nous semble plutôt réservé aux travaux de recherche auxquels elle fournira des coupes minces avec l'assurance d'altérations réduites au minimum.

CHAPITRE V

La coloration du chondriome sans chromage après inclusion au polyvinyle

On sait que, dès 1891, Mallory (23) montra que les acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques pouvaient servir de mordant à l'hématoxyline et donnaient alors des colorations souvent remarquables par leur polychromie. Or ces mordants agissent par les ions molybdiques ou tungstiques, électro-négatifs alors que la plupart des mordants usuels sont des ions métalliques électro-positifs. Nous avons pensé à expérimenter des liquides colorants contenant deux ions mordanceurs de signe opposé. Dans ces conditions, avec l'acide phosphomolybdique et en opérant en deux bains (mordantage et coloration) séparés, car les laques qui se forment sont insolubles et ne se prêtent pas à l'action des colorations en un bain, nous avons remarqué que sur des coupes faites d'après notre méthode d'inclusion, le chondriome était fréquemment visible et devenait beau-

coup plus net après une différenciation au perchlorure de fer. Des recherches précises sur les facteurs pouvant influencer les résultats, nous ont montré que toutes choses étant égales d'ailleurs :

1° Les résultats les meilleurs sont obtenus lorsque les deux ions mordanceux opposés sont en quantité équivalente.

2° L'acide phosphomolybdique agissant seul comme mordant, donne une mauvaise différenciation, un métal agissant seul ne montre pas le chondriome. Le mélange des deux agissant d'autant mieux que l'on se rapproche de la proportion définie ci-dessus.

3° L'hématéine est un meilleur agent colorant que l'hématoxyline. Les solutions fraîches à l'hématéine sont meilleures que les vieilles.

4° Les métaux bivalents, à part l'argent, sont seuls actifs ; par ordre d'activité on classe loin en tête le nickel, puis le Cobalt, le mercure, le cuivre, le zinc, le baryum. Les métaux trivalents sont inactifs, le fer bivalent est oxydé par l'acide phosphomolybdique en fer trivalent et ne donne, par conséquent, aucun résultat.

5° La solution colorante doit être neutre. Les moindres traces d'acidité ou d'alcalinité dans la solution fraîche d'hématéine diminuent considérablement l'intensité et l'élection de la coloration.

6° Le formol salé neutre est le meilleur fixateur, le plus fidèle au point de vue morphologique.

7° La concentration optimum du formol dans le fixateur est de 10 % avec une durée de fixation de 15 jours à 3 semaines.

Ceci posé, il devient facile de définir pratiquement la technique de coloration.

Fixation. — Formol salé isotomique, à 10 % de formol neutralisé, pendant 15 jours à 3 semaines.

Inclusion. — Par la technique au polyvinyle. Les coupes collées sur lames et débarrassées de la masse d'inclusion sont lavées à l'eau ordinaire, puis distillée.

Mordançage. — 15 minutes dans la solution :

Acide phosphomolybdique à 1 % 20 cc.

SO⁴Ni 6 H²O à 2 % 13,6 cc.

qui se conserve longtemps.

Lavage à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée.

Pendant le temps de mordançage on préparera dans un tube à essai de petite taille la solution colorante avec :

Hématéine (1) 2 mm.

Alcool absolu (2) 5 gouttes

Chauffer quelques secondes pour dissoudre (la dissolution n'est d'ailleurs jamais complète) et ajouter :

H²O bidistillée (3) 20 gouttes

Coloration. — Verser le contenu du tube sur la lame et colorer en agitant à chaud jusqu'à émission de vapeurs. Un bec Bunsen, réglé bas, ou mieux la platine chauffante électrique du Prof. POLICARD, seront utilisés.

(1) Pratiquement une pointe d'aiguille lancéolée.

(2) L'alcool ordinaire est fréquemment un peu acide.

(3) A défaut, on utilisera l'eau distillée ordinaire.

pour le chauffage. En 2 à 3 minutes, la coloration est devenue intense, noir bleuté.

Lavage à l'eau ordinaire jusqu'à virage au bleu franc.

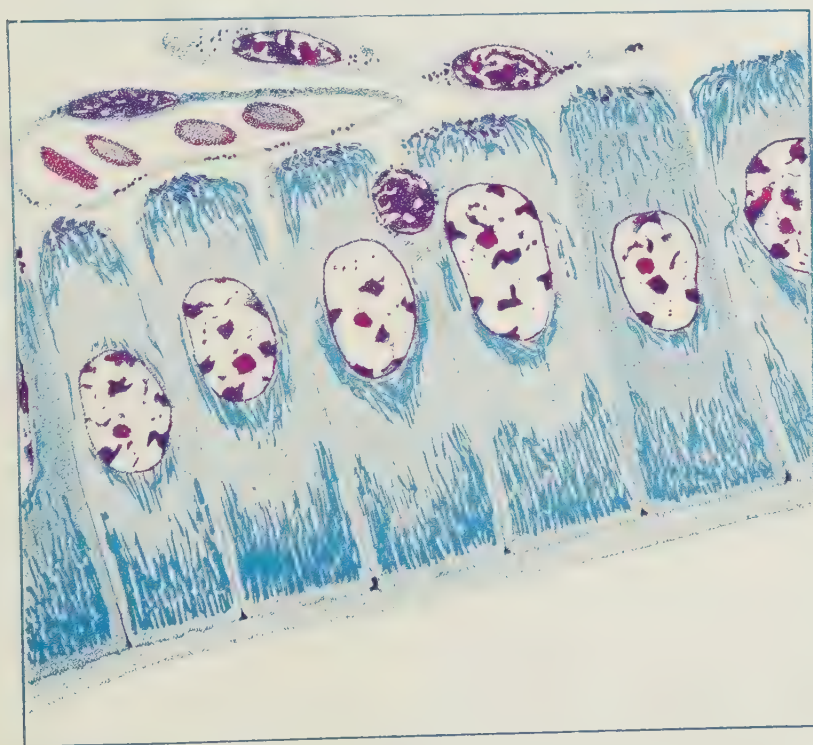
Différenciation. — Agiter la lame dans du perchlorure de fer officinal ; interrompre de temps à autre pour contrôler au microscope le résultat de l'opération, généralement assez rapide (3 à 4 minutes au plus, mais souvent 30 à 40 secondes). Pratiquement l'expérience apprendra la pratique de la différenciation selon l'élément où l'on désire mettre en évidence le chondriome.

Lavage 15 minutes à l'eau ordinaire. Montage selon les procédés habituels, après avoir fait si on le juge utile, une coloration de fond à l'érythrosine ou par tout autre colorant d'aniline.

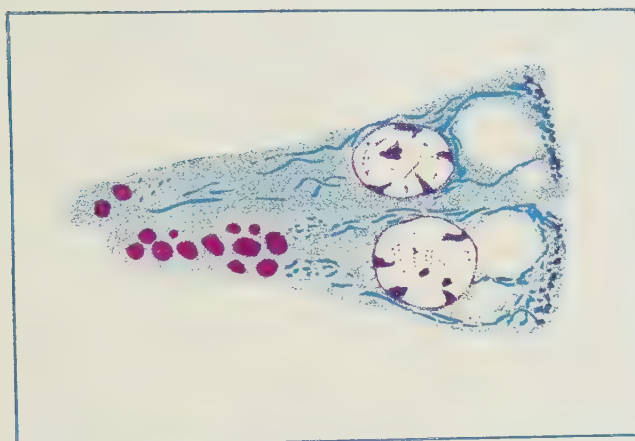
Résultats de la coloration. — Le chondriome est bleu foncé sur le fond bleu clair du cytoplasme. Le noyau est bleu violacé, la nucléole rouge brique. Les grains de sécrétion séreuse prennent la coloration brique analogue à celle du nucléole, mais plus intense, alors que les myofibrilles lisses et les disques sombres des fibrilles striées se colorent comme le chondriome.

Les hématies en violet clair ne sont pas gênantes comme par les techniques de Regaud par l'intensité de leur coloration.

Les résultats sont très constants ; toutes les opérations de coloration étant faites sur coupes. On peut toujours arriver à colorer correctement le chondriome, après quelques essais, en agissant sur le mordantage, la coloration, la différenciation. La planche III montre le chondriome intestinal coloré par cette technique.



1. Paroi des villosités.



2. Cellules de Paneth.

CHONDRIOME (cellules intestinales de Cobaye).

Formol sale 10 %.

Inclusion au Polyvinyle.

Coloration à l'Hématéine phospho molybdo-mickélique.

Dans les techniques habituelles, au contraire, toute la réussite dépend du chromage, dont la valeur ne peut être jugée qu'après inclusion — c'est-à-dire alors qu'il est trop tard pour le modifier.

Appliquée aux coupes à la paraffine, cette méthode ne donne aucun résultat. Tout au plus dans des organes comme le rein ou l'intestin, on remarquera que les zones occupées par le chondriome prennent une coloration bleue diffuse, sans qu'il soit possible d'identifier les éléments mitochondriaux. Mais, chose curieuse, les coupes par congélation donnent également de mauvais résultats, non que la morphologie du chondriome soit altérée, mais le cytoplasme se colore dans ce cas intensément et la différenciation du chondriome est alors très difficile.

Ce n'est pas la place, ici, de nous étendre sur le mécanisme de cette coloration ; disons seulement qu'elle nous paraît se faire par l'intermédiaire d'un constituant lipoidique. En effet, si l'on fixe directement par l'alcool ou le dioxane, aucune coloration n'est possible. Ce constituant lipoidique qui, au moment de la fixation par le formol s'adsorbe sur les protéines au point de ne plus se dissoudre, et ceci sans chromage, dans le dioxane et l'alcool, est-il le même que celui par l'intermédiaire duquel se fait la coloration de Regaud ? Cela ne semble pas car une pièce fixée au formol et traitée par l'alcool ne peut plus, malgré un chromage ultérieur, montrer son chondriome par la méthode de Regaud.

L'inclusion à la paraffine déterminerait la fusion et la diffusion de ce constituant.

La congélation, respectant les lipoïdes du cytoplasme, il n'est pas étonnant alors que la différenciation du chon-

driome deviennent difficile sur un fond qui prend lui-même — bien que moins fortement — la même coloration bleue.

Telle est l'explication que nous avons imaginée pour expliquer les faits constatés. Nous n'accorderons ici, à ces vues théoriques en marge de notre sujet, qu'un intérêt épisodique pour retenir ces deux importantes constatations :

1° Le chondriome, contrairement à l'opinion courante, n'est pas détruit par les solvants gras après une simple fixation au formol, sans chromage.

2° L'inclusion au polyvinyle n'altère pas le chondriome fixé au formol neutre à 10 % et non chromé, puisque sa coloration est encore possible après une telle inclusion. L'inclusion à la paraffine, au contraire, dans les mêmes conditions le détruit. Ce sera là, croyons-nous, la meilleure preuve que nous puissions fournir de la haute valeur cytologique du procédé d'inclusion que nous avons décrit.

Conclusions

I. — La polymérisation en vase clos de l'acétate de vinyle additionné de 3 % de peroxyde de benzoyle, par chauffage de 48 heures à 37°, puis de 48 heures à 56°, donne une masse transparente qui peut jouer le rôle de masse d'inclusion pour la confection de coupes histologiques.

II. — Les coupes ainsi obtenues sont minces ; elles se collent et se colorent sur lames ; leur adhérence au verre est considérable.

III. — Il n'y a aucune tendance à l'effritement ou à la désagrégation des coupes, tant lors de la coupe qu'au moment de l'étalement. Les dispositions de l'anatomie microscopique sont donc parfaitement conservées.

IV. — La conservation cytologique est excellente et, en tous points, comparable à celles des coupes obtenues par congélation. Le chondriome est notamment conservé sans chromage. Après simple fixation au formol, il peut être coloré par une solution fraîche d'hématéine, mordancée par une solution phosphomolybdonique.

V. — Les coupes, collées à la lame, ne montrent presque aucune rétraction par le chauffage, d'où l'utilité de la méthode en microincinération.

VI. — Il est impossible, par contre, d'obtenir des coupes sériées en ruban.

VII. — De ce qui précède, il résulte que cette technique a son emploi indiqué :

- a) en premier lieu pour les recherches cytologiques ;
- b) pour les recherches précises d'anatomie microscopique, à moins qu'il ne soit nécessaire de faire des coupes sériées en vue de reconstruction spatiales ;
- c) pour obtenir des coupes minces dans des objets durs, hétérogènes ou afranctueux.

Vu et approuvé,

Le Doyen :

J. LÉPINE

Vu,

Le Président de la Thèse :

A. POLICARD

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 27 Octobre 1942.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université :

GAU.

Bibliographie

1. Mathias DUVAL. — De l'emploi du Collodion humide pour la pratique des coupes biologiques. *Journal de l'Anat. et de la Physiol.*, XV, p. 185, (1879).
2. GIESBERCHT. — Zur Schneide technik. *Zool. Anzeig.*, IV, p. 483, (1881).
3. MAYER. — Einfache Methode zum Aufkleben Mikroskopischer Schmitte. *Mitsch. zool. station Veaple*, IV, p. 521, (1883).
4. BRASS. — Die Einbettungsmethode mit Benzol und das Sneiden leicht Zerbrechlicher Objekt. *Zeitsch. f. Wiss. Mikr.*, II, p. 301, 1885.
5. LATEUX. — Précis de technique histologique. Paris. 1887.
6. BONNEVAL. — Guide pratique de technique microscopique. Paris, 1890.
7. FLEMMING. — Zellsubstanz und Zellheilung. Leipzig, 1882, p. 381.
8. PERENY. — Über ein neue Erhartungsflussigkeit. *Zool Anzeig.*, V, p. 459, (1882).
9. FOL. — Lerbuch der Vergleichen den Mikroskopischen Anatomie mit Einschluss der Vergleichen den Histologie und Histogenie. Leipzig, 1884.
10. KULCHITZKY. — Zur Kerntiss der modernen Fixierung und Conservietung mittel. *Zeitsch. f. Wiss. Mikr.*, IV p. 346, (1887).

11. BLUM. — Der Formaldehyd als Hartungsmittel. *Zeitsch. f. Wiss. Mikr.*, X, p. 314, (1893).
 12. SCHIEFFERDECKER in « Referate und Besprungen ». *Zeitsch. f. Wiss. Mikr.*, V, p. 503, (1888).
 13. DUVAL — Le collodion dans le technique de l'embryologie. *Journ. de Micrographie*, XII, p. 197, (1888).
 14. KULTCHITZKY. — Celloidin-Paraffin einbettung. *Zeitsch. f. Wiss. Mikr.*, IV, p. 48, (1887).
 15. BOLLES, LEE, HENNEGUY. — Traité des Méthodes techniques de l'Anatomie microscopique. Paris, 1896 (2^e édition).
 16. HEIDENHAIN (Martin). — Ueber eine paraffineinbettung mit Schwefelkohlenstoff als Durchgangs medium. *Zeitsch. f. Wiss. Mikr.*, XVIII, p. 166, (1887).
 17. POSTERNACK. — A reliable one hour method for the preparation of paraffin sections. *Amer. f. Clin. Path.* (Technical supp. IV), p. 13, 1940.
 18. KRAUSE, Rémy COLLIN. — Cours d'Histologie. Paris, 1912.
 19. PUCKETT. — Ethyl Methacrylate as a mounting media for embryological specimen. *Science*, vol. 91, p. 625, (1940).
— Methyl Acrylate plastics as mounting media for biological materials. *Anat. Records*, vol. 80, p. 453, (1941).
 20. BOLLES, LEE, HENNEGUY (voir n° 15).
 21. BOURDON (P.). — Sur l'emploi de la Cyclohexanone comme agent déshydratant et éclaircissant en technique histologique. *Bull. Hist. Appl.*, Année 1942, n° 2, p. 55.
 22. STOWELL. — Action of fixatives and imbedding proceeds on tissues size. *Stain tech.*, vol. 16, p. 67, (1941).
-

Table des Matières

INTRODUCTION	9
CHAPITRE I. — <i>Les principes de la méthode d'inclusion par les résines polyvinyliques.</i>	19
CHAPITRE II. — <i>Technique pratique des inclusions dans les résines polyvinyliques.</i>	25
CHAPITRE III. — <i>La confection des coupes</i>	39
CHAPITRE IV. — <i>Avantages du procédé d'inclusion dans les résines polyvinyliques.</i>	47
CHAPITRE V. — <i>La coloration du chondriome sans chromage après inclusion au polyvinyle.</i>	57
CONCLUSIONS	63
BIBLIOGRAPHIE	65

IMPRIMERIE DE TRÉVOUX
G. PATISSIER

1942

